

BEST AVAILABLE COPY

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 3029307 A1

⑤① Int. Cl. 3:  
A61K31/715  
A 61 K 31/40

②① Aktenzeichen:  
②② Anmeldetag:  
④③ Offenlegungstag:

P 30 29 307.3  
1. 8. 80  
4. 3. 82

Behördeneigentum

⑦① Anmelder:

Dr. Eduard Fresenius, Chemisch-pharmazeutische Industrie  
KG, 6380 Bad Homburg, DE

⑦② Erfinder:

Pitz, Heiner, Dipl.-Chem. Dr., 6382 Friedrichsdorf, DE;  
Sommermeyer, Klaus, Dipl.-Chem. Dr., 6365 Rosbach, DE

⑤④ Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel

DE 3029307 A1

DE 3029307 A1

KUHNEN & WACKER

PATENTANWALTSBÜRO

3029307

REGISTERED REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

Dr. B. Fresenius  
Chem. pharm. Industrie KG

6380 Bad Homburg

PATENTANWÄLTE  
R.-A. KUHNEN\*, DIPL.-ING.  
W. LUDERSCHMIDT\*\*, DR. DIPL.-CHEM.  
P.-A. WACKER\*, DIPL.-ING., DIPL.-WIRTSCH.-ING.

11 FR 0331 4/gc

### Patentansprüche

1. Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel der allgemeinen Formel I



bei dem zellfreies Hämoglobin Hb kovalent über reaktive Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  und einen Brückenliganden B mit einem Polysaccharid M verbunden ist, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t, daß B eine ggf. ein- oder mehrfach ungesättigte aliphatische Gruppe mit 3-14 C-Atomen, eine Cykloalkylgruppe mit bis zu 14 C-Atomen oder eine Arylgruppe mit bis zu 14 C-Atomen bedeutet und die Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  gleich oder verschiedenen Gruppierungen der Formel  $-O-$ ,  $-NH-$ ,  $-N-$ ,  $-S-$ ,  $-S(CH_2)-$ ,  $-N-(CH_2)_m-NH-$ ,  $-NH-(CH_2)_m-NH-$ ,  $-N-(CH_2)_m-N-$ , eine Carboxy- oder eine Hydrazidgruppe bedeutet, wobei  $m = 0$  oder eine ganze Zahl von 1-14 bedeutet.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Alkylgruppe mit 4-10 C-Atomen bedeutet.
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Alkylgruppe von 4-8 C-Atomen bedeutet.

BÜRO 6370 OBERURSEL\*\*  
LINDENSTRASSE 10  
TEL. 06171/56649  
TELEX 4186343 real d

BÜRO 6050 FRESING\*\*  
SCHNEEGSTRASSE 3-5  
TEL. 08161/62091  
TELEX 526547 pawal d

ZWEIGBÜRO 8330 PASSAU  
LUDWIGSTRASSE 2  
TEL. 0851/36616

TELEGRAMMADRESSE PAWAMUC POSTSCHECK MÜNCHEN 1360 52-602

ORIGINAL INSPECTED

010845

3029307

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Butylgruppe bedeutet.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Pentylgruppe bedeutet.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Hexylgruppe bedeutet.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B ein von trimerisiertem Glutardialdehyd stammender Rest ist und  $R_1$  eine Gruppe der Formel  $-N-(CH_2)_m-N-$  oder  $-NH-(CH_2)_m-NH-$  ist, wobei m die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzt.
8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß m den Wert = 0 hat.
9. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_2$  die gleiche Bedeutung wie  $R_1$  besitzt, wobei m = 0 ist.
10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  und  $R_2$  jeweils eine Gruppe -O- sind und B eine Phenylgruppe darstellt, die in 1- und 4-Stellung mit den Resten  $R_1$  und  $R_2$  verbunden ist.
11. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M Dextran mit einem Molekulargewicht von  $M_w = 10.000$  bis  $500.000$  ist.
12. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M Hydroxyäthylstärke mit einem Molekulargewicht von  $M_w = 10.000$  bis  $500.000$  ist.
13. Verfahren zur Herstellung des Blutersatzmittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) entweder die Hydroxygruppe eines Polysaccharids

01.03.50

3029307

aktiviert und das erhaltene aktivierte Produkt mit einer funktionellen Endgruppe einer Brücke B verknüpft, oder das Polysaccharid M mit einer stark reaktiven Endgruppe der Brücke B verknüpft und  
b) das erhaltene Produkt über die andere endständige reaktive Gruppe der Brücke B mit zellfreiem Hämoglobin verbindet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid durch Perjodat zu einer Aldehydgruppen enthaltenden Verbindung aktiviert wird, die mit einer oder mehreren endständigen Aminogruppen der Brücke B oder mit Hydrazin umgesetzt wird, wobei das mit Hydrazin erhaltene Produkt mit einer endständigen Aldehydgruppe der Brücke B umgesetzt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M mit p-Benzochinon bei einem pH-Wert von 6-8 und anschließend das erhaltene Produkt mit Hämoglobin umgesetzt werden.

# KUHNEN & WACKER

PATENTANWALTSBÜRO

3029307

REGISTERED REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

Dr. E. Fresenius  
Chem. pharm. Industrie KG

6380 Bad Homburg

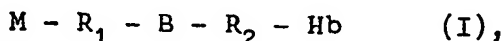
PATENTANWÄLTE

R.-A. KUHNEN\*, DIPL.-ING.  
W. LUDERSCHMIDT\*, DR., DIPL.-CHEM.  
P.-A. WACKER\*, DIPL.-ING., DIPL.-WIRTSCH.-ING.

11 FR 0331 4/gc

## Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel

Die Erfindung betrifft ein Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel der allgemeinen Formel I,



bei dem zellfreies Hämoglobin Hb<sup>k</sup>kovalent über reaktive Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  und einen Brückenliganden B mit einem Polysaccharid M verbunden ist, für den Sauerstofftransport sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung.

Üblicherweise können Blut- und Plasmaverluste bis zu etwa 1,5 l durch Infusion kolloidaler Volumenersatzmittel ausgeglichen werden. Zu derartigen Volumenersatzstoffen gehören beispielsweise Dextrane, Hydroxyäthylstärke und Gelatine. Wenn jedoch dieses Volumen von ca. 1,5 l überschritten und nicht sofort ersetzt wird, entsteht beim menschlichen oder tierischen Organismus der hämorrhagische Schock, da derartige Blutverluste nicht ohne Gefahr durch erythrozytenfreie Lösungen aufgefüllt werden dürfen. In einem solchen Fall kann nur Vollblut übertragen werden, dem die bekannten Risiken anhaften. Zu derartigen Risiken gehören eine beschränkte Lagerfähigkeit, die Gruppenspezifität (Rhesusfaktoren u. dgl.), Immunisierungsprobleme, die durch körperfremde Substanzen entstehen, mit Krankheitsträgern (bei-

BÜRO 6370 OBERURSEL  
LINDENSTRASSE 10  
TEL. 06171 50849  
TELEX 4180343 real d

BÜRO 8560 FREISING  
SCHNEIDERSTRASSE 3-5  
TEL. 08161 62041  
TELEX 526547 paw d

ZWEIGBÜRO 83300 PASSAU  
LUDWIGSTRASSE 2  
TEL. 0851/36616

TELEGRAMMADRESSE PAIVAMUC -- POSTSCHECK MÜNCHEN 1360 52-802

ORIGINAL INSPECTED

-2-

- 1 spielsweise Hepatitisviren) infizierte Vollblutkonserven,  
Aggregatbildung von Blutplättchen und Blutkörperchen u. dgl.  
Diese und weitere Risikofaktoren sind beispielsweise in der  
Monographie von U.F. Gruber "Blutersatz", Springer-Verlag,  
5 1968, beschrieben.

- Zur Lösung des Problems wurden u.a. Emulsionen von fluor-  
ierten Kohlenwasserstoffen und der zellfreie Einsatz von  
Hämoglobinlösungen vorgeschlagen. Diese Versuche scheiter-  
10 ten jedoch, da einerseits bei den fluorierten Kohlenwasser-  
stoffen keine ausreichende Emulsionsstabilität und quanti-  
tative Ausscheidung gegeben sind, andererseits auch nach  
der vollständigen Beseitigung von Zellfragmenten, die zu  
nierentoxischen Effekten führten, das stromafreie, gelöste  
15 Hämoglobin weder die erforderliche Sauerstoffaufnahme- oder  
-abgabekapazität aufweist noch ausreichend lange im Körper  
verbleibt, da es bereits nach relativ kurzer Zeit durch die  
Niere ausgeschieden wird. Um die Halbwertszeit der Ausschei-  
dung zu erhöhen, wurden deshalb gem. DE-OS 26 46 854 Sub-  
20 stanzen zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrecker er-  
zeugt, bei denen Hämoglobin über eine kovalente Bindung an  
ein makromolekulares Produkt gebunden ist. Während als Ma-  
kromoleküle Dextran oder Hydroxyäthylstärke, die jeweils ein  
Molekulargewicht von 5000 bis 2000000 besitzen, in Frage  
25 kommen können, wird die kovalente Bindung dadurch herge-  
stellt, daß Hydroxygruppen der Polysaccharide aktiviert und  
diese aktivierten funktionellen Gruppen, ggf. über einen  
Brückenliganden, mit dem Hämoglobin gekuppelt werden. Akti-  
vierte Zwischenprodukte der Makromoleküle lassen sich durch  
30 Reaktionen mit Bromcyan, einem  $\omega$ -Halogenalkylamin oder Per-  
jodat herstellen. Anschließend erfolgt entweder eine direkte  
Kupplung mit Hämoglobin oder eine Ankupplung über einen  
kurzkettigen Spacer. Obwohl durch die Ankupplung die Aus-  
scheidungen von Hämoglobin durch die Niere ver-  
35 langsam werden, wodurch die Wirkungsdauer des Hämoglobin  
erheblich erhöht wird, ist andererseits die Sauerstoffbin-  
dungs- und-abgabeeigenschaft des Endprodukts gem. DE-OS  
26 46 854 nicht ausreichend, da bei weitem nicht die sigmoide

1 Sauerstoffaufnahme -/abgabekurve des reinen Hämoglobins er-  
reicht wird. Diese sigmoide Funktion ist jedoch eine wichtige  
Voraussetzung für die Sauerstoffaufnahme in der Lunge und  
Sauerstoffabgabe in den peripheren Muskelgeweben. Sofern  
5 diese Eigenschaft nicht in einem genügenden Maß erreicht  
wird, besteht weiterhin die Gefahr eines hämorrhagischen Schocks.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Blut-  
ersatzmittel auf der Basis eines an eine makromolekulare  
10 Verbindung gekoppelten Hämoglobins zu schaffen, das einer-  
seits eine hohe Verweildauer im Körper aufweist, anderer-  
seits der Sauerstoffaufnahme- oder Abgabeeigenschaft des  
natürlichen Hämoglobins weitgehend angenähert ist.

15 Diese Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des  
Anspruchs 1 gelöst.

Das erfindungsgemäße Blutersatzmittel läßt sich bei Mensch  
und Tier gleichermaßen einsetzen, wobei die vorstehend ge-  
nannten Nachteile, die durch Übertragung von konserviertem  
20 Blut entstehen, nicht auftreten. Weiterhin läßt sich dieses  
Mittel über lange Zeit lagern und kann im Bedarfsfall durch  
einfaches Mischen mit Wasser und Auflösen darin sofort ein-  
gesetzt werden.

25 Dabei hat sich herausgestellt, daß die Volumenverweilzeit  
in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Modifizierung  
des Brückengliedes variiert und bis zu 10h betragen  
kann, d.h., daß nach 10 Stunden noch 50% des infundierten  
30 Volumens im Kreislauf nachzuweisen sind. Außerdem sind die  
erfindungsgemäßen Produkte biologisch akzeptabel und er-  
zeugen u.a. keine allergischen Reaktionen.

Die erfindungsgemäßen Produkte bestehen im wesentlichen aus  
35 Polysaccharid als makromolekulare Verbindungen, die als Ma-  
trix M bezeichnet werden, einer chemischen Brücke B ("Spacer")  
und einem Liganden Hb, wobei die Brücke B jeweils über reak-  
tive Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  mit der Matrix M bzw. dem Liganden Hb,

7 010930

3029307

-\*-

1 der das Hämoglobin darstellt, verbunden ist.

5 Als Matrix kommen makromolekulare Polyhydroxy-Verbindungen, wie Polysaccharide, in Frage, wobei Dextrane und Hydroxy-  
 10 athystärke mit einem Molekulargewicht von 5000 bis 1000000 bevorzugt sind. Besonders bevorzugt sind \*Dextrane 40 und 70  
 klinische sowie/Hydroxyäthylstärke die einen Anteil von mindestens 90 % Amylopectin-Hydrolysat, eine Eigenviskosität von 0,05-  
 0,3 dl/g bei 25° C, einen Äthersubstitutionsgrad bis 0,9 Hydroxyäthylgruppen/Glucoseeinheit, ein gewichtsgemitteltes  
 15 Molekulargewicht  $M_w$  bis 700000, und ein teilchengemitteltes Molekulargewicht  $M_n$  bis 100000 aufweist. Die Dextrane sowie die Hydroxyäthylstärke sind als solche im Handel und deshalb leicht erhältlich. \* die klinischen

15 Als Hämoglobin wird vorteilhaft zellfreies (stromafreies) Hämoglobin eingesetzt, das aus frischem Humanblut frei von Antigenen, Zellbestandteilen und Pyrogenen lyophilisiert hergestellt wurde. Hierzu bedient man sich beispielsweise  
 20 eines Druckfiltrationsgerätes mit einem Membranfilter der Porengröße 3µm, um das Humanblut zellfrei zu filtrieren.

25 Als chemische Brücke B kommen gerad- oder verzweigt-kettige aliphatische Gruppen mit 3 - 14 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 4 - 10, insbesondere 4 - 8 Kohlenstoffatomen infrage. Spezielle Beispiele für gerad- oder verzweigt-kettige Alkylgruppen sind die Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Heptyl-, Oktyl-, Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl- und die Myristylgruppe wie deren isomere Formen. Vorstehend genannten Alkylgruppen können auch eine oder mehrere ungesättigte Bindungen  
 30 enthalten. Beispiele für Alkenylgruppen sind die Allyl-, 1-Methylallyl-, 2-Methylallyl-, (Methallyl-), 2-Butenyl-, (Crotyl-), 3-Butenyl-, 1,2-Dimethylallyl-, 1,1-Dimethylallyl-, 2-Äthylallyl-, 1-Methyl-2-butenyl-, 2-Methyl-2-butenyl-, 3-Methyl-2-butenyl-, 3-Pentenyl-, 2,3-Dimethyl-2-butenyl-, 1,1,2-Trimethylallyl-, 1,3-Dimethyl-2-butenyl-, 1-Äthyl-2-butenyl-, 4-Methyl-2-pentenyl-, 2-Äthyl-2-pentenyl-, 4,4-Dimethyl-2-pentenyl-, 2-Heptenyl-, 2-Oktenyl-, 5-Oktenyl-, 2-Nonenyl-, 2-Decenyl-, 2-Dodocenyl- und dgl.



- 1 Vorstehenden Alkylgruppen können auch in der Seitenkette Alkoxygruppen aufweisen, wobei beispielsweise die 2-Methoxypropyl-, 3-Methoxypropyl-, 3-Propoxypropyl-, 2-Methoxybutyl-, 3-Äthoxybutyl-, 4-Butoxybutyl-, 2-Äthoxyhexyl-, 3-Methoxy-3-methylpentyl-, 4-Methoxyoktylgruppe in Frage kommen können.

- Die vorstehenden Alkylgruppen, die ggf. ein oder mehrere ungesättigte Bindungen oder Alkoxygruppen aufweisen, können mit zunehmender Kettenlänge wasserunlöslich werden, was sowohl bei der Synthese als auch beim Endprodukt von Nachteil sein kann. Diese Eigenschaft läßt sich dadurch verbessern oder aufheben, daß ein oder mehrere Hydroxygruppen eingeführt werden. Spezielle Beispiele für derartige Gruppen sind Abkömmlinge von Di-, Tri- und Tetraglycerin.

- 15 Die vorstehenden  $C_3$ - $C_{14}$  haltigen Gruppen können auch als Cycloalkylgruppen vorliegen, wobei die Cyclohexyl-, 4-tert-Butylcyclohexyl-, 3-Isopropylcyclohexyl-, 2,2-Dimethylcyclohexyl-, Cycloheptyl- und die Cylooktylgruppe in Frage kommen können.
- 20 Die reaktiven Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  sind bei den zyklischen Gruppierungen vorzugsweise in 1,4 Stellung ankondensiert.

- Zu  $C_3$ - $C_{14}$  haltigen Gruppen gehören weiterhin Arylgruppen, wie die Phenyl-, Biphenyl-, 1-Naphtyl- und die 2-Naphtylgruppe, die ggf. mit den vorstehend genannten Alkyl-, Alkenyl-, Alkoxyalkyl-, oder Cycloalkylgruppen substituiert sein können.

- 25

- Beispiele für Alkarylgruppen sind die o-Tolyl-, m-Tolyl-, p-Tolyl- und die p-tert-Butylphenylgruppe, die isomere Form der Xyl-Gruppen, die isomeren Formen der Trimethylphenylgruppen und die 4-Äthyl-1-naphtylgruppe.

- 30

- Beispiele für Aralkylgruppen sind die Benzyl-, Phenyläthyl-, 1-Phenyläthyl-, 2-Phenylpropyl-, 4-Phenylbutyl-, 6-Phenylhexyl-, 5-Phenyl-2-methylphenyl- und 1-Naphtyl-methylgruppe.

- 35

- Beispiele für Alkarylgruppen sind die o-Tolylmethyl-, m-Tolylmethyl-, p-Tolylmethylgruppe und dgl.

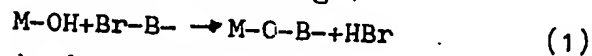
- 1 Beispiele für Alkoxyaralkylgruppen sind die o-Methoxyphenyl-, m-Methoxyphenyl-, p-Methoxyphenyl-, 2-(m-Methoxyphenyl)-ethyl-, 4-Methoxy-1-naphtylmethylgruppe und dgl.
- 5 Als reaktive Gruppen  $R_1$  und  $R_2$ , die jeweils die Verbindung zwischen der Brücke B und der Matrix M bzw. dem Hämoglobin Hb darstellen und die gleiche oder verschiedene Bedeutung besitzen können, kommen üblicherweise folgende Gruppierungen in Frage:
- 10  $-O-, -NH-, -N-, -S-, -S(CH_2)_m-, -N-(CH_2)_m-NH-, -NH-(CH_2)_m-NH-,$   
 $=N-(CH_2)_m-N=, -NH-(CH_2)_m-N=$ , wobei m entweder 0 (also mit dem Ausgangsprodukt Hydrazin) oder eine ganze Zahl von 1-14 bedeutet,  $-O-\overset{\overset{O}{||}}{C}-$  oder  $-NH-\overset{\overset{O}{||}}{C}-$ .
- 15 Bevorzugte reaktive Gruppen  $R_1$  und  $R_2$  sind die Gruppierungen der Formel
- $-O-, -NH-, -N-, -NH-NH-, -N-N=, -O-\overset{\overset{O}{||}}{C}-$  und  $-NH-\overset{\overset{O}{||}}{C}-$ .
- 20 Precursoren für die vorstehend genannten Gruppierungen  $R_1$  und  $R_2$  sind Halogenatome, Amino-, Amid-, Carboxyl-, Carbonyl-, Säurehalogenid-, Säureacid-, Sulfhydryl-, Imidazo- und Thio-methylgruppen.
- 25 Bevorzugte Ausgangsverbindungen sind  $\alpha, \omega$ -Diamine der allgemeinen Formel II
- $$H_2N-B-NH_2 \quad (II)$$
- 30 und  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren der allgemeinen Formel III
- $$H_2N-B-COOH. \quad (III)$$
- Besonders bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel
- 35 II und III sind diejenigen, bei denen B aliphatische Gruppen mit 3-14 Kohlenstoffatomen darstellt.

A-

1 Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Blutersatzmittels wird  
üblicherweise zuerst die Brücke B an die Matrix M über die  
reaktive Gruppe  $R_1$  angekuppelt und anschließend wird das er-  
haltene Produkt über die zweite reaktive Gruppe  $R_2$  mit dem  
5 zellfreien Hämoglobin verbunden. Die Reihenfolge der Kuppe-  
lung ist jedoch nicht erfindungswesentlich und kann deshalb  
umgekehrt werden.

Um eine Brücke B mit der Matrix M zu koppeln, muß einer der  
10 beiden Reaktionsteilnehmer mindestens eine reaktionsfreudige  
Gruppe aufweisen. Da als Matrix M gewöhnlich Polysaccharide,  
also Verbindungen mit OH-Funktionen eingesetzt werden,  
müssen entweder diese Hydroxy-Gruppen der Polysaccharide in  
eine reaktive Form überführt werden oder aber die Brücke B  
15 muß besonders reaktionsfreudige Gruppen aufweisen, bei-  
spielsweise Halogenatome oder Doppelbindungen, die mit der  
Hydroxygruppe reagieren können.

Unter den Halogenatomen ist das Bromatom bevorzugt, das nach  
20 folgender Gleichung 1

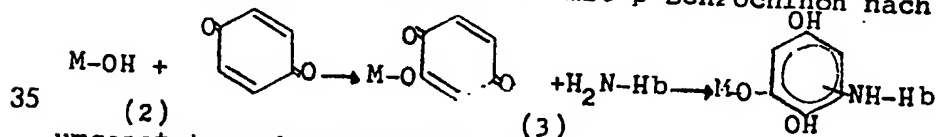


in der M-OH die Matrix mit einer beliebig ausgewählten OH-  
Gruppe bedeutet und die Brücke B die vorstehende Bedeutung  
besitzt, mit der Matrix unter Abspaltung des entsprechenden  
25 Bromwasserstoffs reagieren kann.

Das nach der Gleichung 1 erhaltene Produkt kann wiederum  
über eine entsprechende reaktive Gruppe  $R_2$  mit dem Hämoglobin  
umgesetzt werden.

30

Andererseits kann die Matrix M auch mit einer reaktiven  
Doppelbindung, beispielsweise mit p-Benzochinon nach Gleichung 2



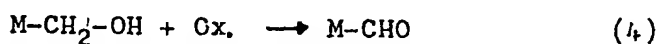
umgesetzt werden. Das erhaltene Produkt kann mit einer Amino-  
gruppe des Hämoglobins nach Gleichung 3 reagieren.

Diese Reaktion ist stark vom pH-Wert abhängig. Bei einem

-8-

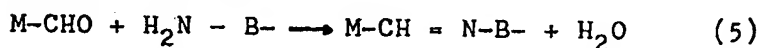
- 1 pH-Wert von 9 treten beispielsweise starke Vernetzungen und Farbbildung auf, während die Reaktion bei einem pH-Wert von 7 offensichtlich zu einem geringeren Vernetzungsgrad führt. Durch Steuerung des pH-Wertes lassen sich also beliebige
- 5 Vernetzungsgrade erzeugen, so daß unterschiedlich hohe Molekulargewichte die aus mehreren Matrix- und Hämoglobineinheiten herrühren, erhalten werden können.

- 10 Wenn die Brücke B endständige funktionelle Gruppen aufweist, die nicht mit einer Hydroxygruppe der Matrix reagieren können, muß diese Hydroxygruppe der Matrix aktiviert werden, wobei häufig eine milde Oxidation mit Natriumperjodat nach folgender Gleichung 4 bevorzugt ist



- 15 Es können jedoch auch andere reaktive Stoffe, beispielsweise Acylhalogenide, Alkylhalogenide, Isocyanate oder Bromcyan eingesetzt werden.

- 20 Das nach Gleichung 4 erhaltene Produkt kann beispielsweise mit der Aminogruppe als endständige Gruppe der Brücke B nach Gleichung 5



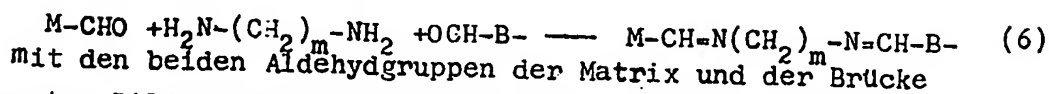
- unter Bildung einer Schiff'schen Base umgesetzt werden. Da
- 25 derartige Schiff-Basen häufig nicht besonders stabil sind und zur Bildung von Folgeprodukten neigen, werden sie vorzugsweise mit Natrium- oder Lithiumborhydrid, je nach dem eingesetzten Lösungsmittel, hydriert.

- 30 Wenn die endständige reaktive Gruppe der Brücke B eine Aldehyd-Gruppe ist, so erfolgt die Kupplung mit der gemäß Gleichung 5 aktivierten Matrix mit Hilfe einer Verbindung mit zwei endständigen Aminogruppen der allgemeinen Formel



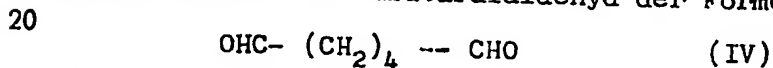
- 35 in der m die Bedeutung von 0 (Hydrazin) besitzt oder eine ganze Zahl von 1-14 darstellt.

Die Verbindung mit der allgemeinen Formel IV reagiert nach folgender Gleichung 6

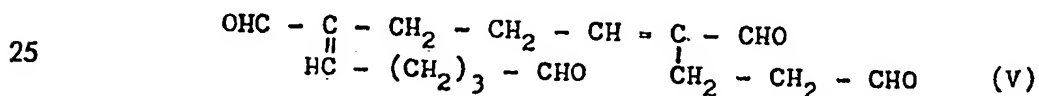


5 unter Bildung einer doppelten Schiff'schen Base. Bevorzugt ist bei dieser Umsetzung die Verwendung von Hydrazin. Weiterhin ist bevorzugt, daß die nach Gleichung 6 erzeugten Schiff'schen Basen hydriert werden.

10 Setzt man gemäß Gleichung 6 eine Brücke mit zwei endständigen Aldehydgruppen, also einen Dialdehyd ein, wie Malondialdehyd, Succindialdehyd, Glutardialdehyd und dgl., dann ist der Reaktionsmechanismus dieser Dialdehyde häufig nicht gesichert, da sowohl die Aldehydgruppen unter Bildung von Schiff'schen Basen als auch die durch Keto-Enol-Tautomerie gebildeten Doppelbindungen gemäß der Michael-Addition (Reaktion mit aktiven Methylengruppen oder Stickstoffatome enthaltenden Funktionen) mit der endständigen Aminogruppe reagieren können. Der Glutardialdehyd der Formel IV



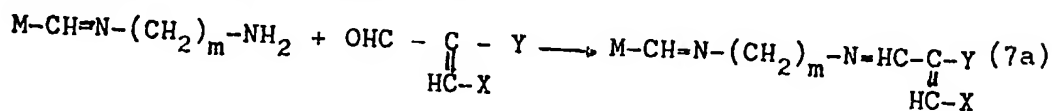
liegt häufig trimerisiert in seiner crotonisierten Form der allgemeinen Formel V vor



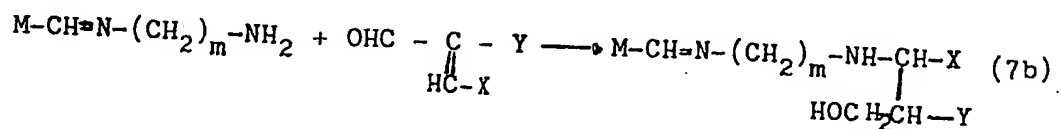
Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Reaktion des trimerisierten Glutardialdehyds mit dem Reaktionsprodukt aus Hydrazin und der aktivierten Matrix gemäß Gleichung 4 einerseits und dem zellfreien Hämoglobin andererseits. Nach der Wahl des pH-Werts können entweder die freien Carbonylfunktionen des trimerisierten Glutardialdehyds oder aber die Doppelbindungen mit aktiven Wasserstoffatomen, beispielsweise der Amino- oder Thiogruppe reagieren. Da die Brücke B lediglich als spacer, also zur Erzeugung eines bestimmten Abstandes zwischen Matrix und Hämoglobin dienen soll, können beide Reaktionsarten gleichermaßen zur Brücken-

1 bildung eingesetzt werden.

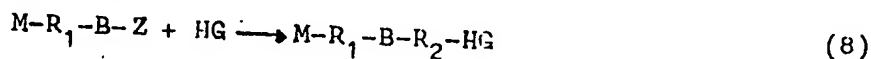
5 Diese Reaktionen sind in der nachfolgenden Gleichung 7 a und 7 b gezeigt, in der der trimerisierte Glutardialdehyd verkürzt dargestellt ist, wobei die Gruppen X und Y die nicht in die Reaktion eingreifende Reste des Glutardialdehyd der allgemeinen Formel V darstellen.



10



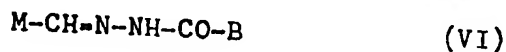
15 Die nach Gleichung 1, 5, 6 und 7 erhaltenen Produkte aus der Umsetzung der Matrix M mit einer Brücke B werden nach der Gleichung 8



20

in der Z eine funktionelle Gruppe darstellt, mit Hämoglobin zum erfindungsgemäßen Endprodukt der allgemeinen Formel I umgesetzt. Als Gruppe Z kommen die Carboxyl-, Amid-, Carbonyl-, Amino-, Thio-, oder Thiomethylgruppe in Frage. Die Gruppen mit der Bedeutung Z können mit einer oder mit mehreren reaktiven Gruppen des Hämoglobinmoleküls, wie Amino-, Thio-, Carboxyl- oder Thiomethylgruppen reagieren. Weiterhin kann die Gruppe Z auch eine Doppelbindung, beispielsweise die Doppelbindung des trimerisierten Glutardialdehyds bedeuten, die mit aktivierten Wasserstoffen, beispielsweise der Amino- 30 gruppe oder der Thiogruppe reagieren kann.

Die nach Gleichung 4 erhaltene aktivierte Matrix kann auch mit einem Hydrazid oder Dihydrazid einer  $\alpha, \omega$ -Dicarbonsäure 35 oder einer  $\omega$ -Aminocarbonsäure umgesetzt werden, wobei eine mit einer Brücke versehene Matrix der allgemeinen Formel VI



- erhalten wird. In der Formel VI ist wie in den vorstehenden Formeln und Gleichungen die Bedeutung der endständigen Gruppe offengehalten und kann beispielsweise eine Gruppe der Bedeutung Z, eine Säurehydrazidgruppe und dgl. sein.
- 5 Die Kupplung dieser Gruppen mit aktiven Gruppen des Hämoglobins erfolgt entweder aufgrund ihrer eigenen Reaktivität oder aber über aktivierte Zwischenzustände, beispielsweise über N-Hydroxysuccinimide und dgl., wie sie beispielsweise aus der Peptid-Synthese bekannt sind.
- 10 Doppelbindungen lassen sich, wie bereits vorstehend festgestellt, durch Hydrierung mit Alkalisalzen von Borhydriden hydrieren. Übrig gebliebene Carbonylfunktionen werden blockiert, beispielsweise durch TES, das nachstehend beschrieben ist. Die Zwischen- und Endprodukte werden üblicherweise
- 15 gegen destilliertes Wasser dialysiert und dadurch gereinigt.
- Die Umsetzung eines Brückenmoleküls mit der Matrix beträgt üblicherweise 5:1, vorzugsweise 1:1. Das dadurch erzeugte
- 20 Zwischenprodukt aus Brückenglied und Matrix kann bis zu 5 Hämoglobinsmoleküle entnehmen und nimmt vorzugsweise ein Hämoglobinsmolekül auf. Ein besonders bevorzugtes Endprodukt der allgemeinen Formel I besteht aus jeweils einem Molekül Matrix, Brücke und Hämoglobin.
- 25 Nachstehend werden die allgemeinen Reaktionsbedingungen beschrieben, die zu den vorstehend beschriebenen Zwischen- und Endprodukten führen.
- 30 Die Aktivierung von Polysacchariden durch Oxydation mit Perjodat gemäß Gleichung 4 wird nach der Methode von Fleming et al, Acta biol med germ. Bd. 30 (1973) S. 177 durchgeführt, wobei man in Wasser oder alkoholischen Wassergemischen arbeitet. Die Reaktionstemperatur liegt
- 35 normalerweise zwischen 0 und 50, vorzugsweise zwischen 5° C und der Raumtemperatur. Die Reaktionszeit hängt vom Substitutionsgrad der Reaktionsteilnehmer, also beispielsweise der Hydroxyäthylstärke HES ab und steigt mit steigen-

- 1 dem Substitutionsgrad an. Die Abtrennung und Reinigung des erhaltenen Produkts erfolgt durch Dialyse gegen aqua dest.

5 Das mit Perjodat oxidierte Produkt wird bei einem pH-Wert von 3-7, vorzugsweise 4,5-5,5 mit einem  $\alpha,\omega$ -Diamin oder einer  $\omega$ -Aminocarbonsäure gemäß Gleichung 5 umgesetzt, wobei der pH-Wert unter Kontrolle gehalten wird. Es wird mit hohem Überschuß an Diamin oder Aminocarbonsäure gearbeitet, um möglichst sämtliche Carbonylgruppen umzusetzen. Die Umsetzung erfolgt üblicherweise bei Raumtemperatur innerhalb  
10 einer Zeit von 4-10 Stunden.

Um restliche Carbonylfunktionen zu blockieren, wird beispielsweise TES (N-Tris(Hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure) zugesetzt. Anschließend erfolgt die Reinigung  
15 des Produkts wiederum durch Dialyse gegen aqua dest.

Sofern ein Diamin mit der aktivierten Polysaccharidverbindung umgesetzt worden ist, kann die endständige Aminofunktion mit  
20 Glutardialdehyd nach Gleichung 7 verlängert werden, wobei vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7-8, insbesondere bei 7,5 (Phosphatpuffer mit einer Phosphatkonzentration von etwa 0,5 Mol.) gearbeitet wird. Die in wässriger Lösung ablaufende Umsetzung erfolgt üblicherweise bei Temperaturen oberhalb der  
25 Raumtemperatur, vorzugsweise zwischen 30 und 50°, insbesondere bei 37° C über einen Zeitraum von mehreren Tagen, vorzugsweise 15-25 Stunden. Die Reinigung des Endproduktes erfolgt wiederum durch Dialyse gegen aqua dest.

30 Falls das oxidierte Polysaccharidprodukt mit einer endständigen Aminofunktion gekuppelt wird, entsteht eine Schiff'sche Base gemäß Gleichung 5, deren Doppelbindung ggf. durch Reduktion mit Natriumborhydrid in wässriger Lösung bei alkalischen Bedingungen (pH ca. 9) beseitigt werden kann. Nach der  
35 Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  arbeitet man unterhalb der Raumtemperatur zwischen 8 und 24 Stunden, vorzugsweise 12 Stunden weiter. Da bei Einsatz von  $\text{NaBH}_4$  neben der Reduzierung der Doppelbindungen auch die übrig gebliebenen Carbonylgruppen zu



- 1 Hydroxygruppen reduziert wurden, erübrigt sich die Zugabe von TES. Die übrigen Reaktionsteilnehmer werden vom Reaktionsprodukt wiederum durch Dialyse gegen aqua dest. entfernt.
- 5 Die Umsetzung mit Benzochinon gemäß Gleichung 2 erfolgt üblicherweise unter Verwendung von Polysaccharid und p-Benzochinon, wobei das Benzochinon in einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Ethanol, gelöst wird. Um eine zu starke Kopplung zu vermeiden, wird bei einem pH-Wert von 6-8, vorzugsweise 7 gearbeitet, wobei zweckmäßigerweise wiederum Phosphatpuffer verwendet wird.
- 10

Die vorstehend erhaltenen Zwischenprodukte, die ein Makromolekül als Matrix und eine chemische Brücke aufweisen, werden mit dem freien Ende der chemischen Brücke an zellfreies Hämoglobin angekoppelt, wobei üblicherweise bei pH-Werten von 8-11, vorzugsweise 9,5 (Bicarbonatpuffer) und Temperaturen von etwa 0-30, vorzugsweise 5-10° C gearbeitet wird.

15

- 20 Hochmolekulare Vernetzungsprodukte werden anschließend durch Filtration, beispielsweise durch Druckfiltration gereinigt. Das klare Filtrat läßt sich weiter in einer Ultrafiltrationsanlage, beispielsweise von der Firma AMICON, über eine Membran, beispielsweise die mit PM 10 bezeichnete Membran fraktionieren, sofern der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wird. Das erhaltene Produkt wird durch Gefriertrocknen in eine stabile Form überführt und kann über lange Zeit aufbewahrt werden.
- 25

- Wenn andererseits als Brückenglied eine  $\omega$ -Aminocarbonsäure gemäß Gleichung 5 eingesetzt wird, kann das erhaltene Produkt durch Umsetzung seiner endständigen Carboxylgruppe mit aktivierenden Substanzen, beispielsweise N-Hydroxysuccinimide oder EDAC (1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid), umgesetzt werden, wobei bei dem ersten Diimid wasserfrei und bei EDAC in Wasser gearbeitet wird. Diese Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) führt durch Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid zu einem aktiven Ester, der mit einer Aminofunktion oder Thiofunktion des Hämoglobins zum gewünschten
- 30
- 35

- 1 Endprodukt reagieren kann. Diese Reaktion von DCC wird üblicherweise in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Dioxan durchgeführt, wobei die Umsetzungszeit zwischen einer und vier Stunden variieren kann.
- 5 Sofern jedoch ein wasserlösliches Carbodiimid, beispielsweise EDAC, zum Einsatz kommt, kann das aus der Kopplung mit Polysaccharid und  $\alpha$ -Aminocarbonsäure erhaltene Produkt direkt in Wasser mit Hb, umgesetzt werden, wobei wiederum die Carboxylgruppe mit einer  $\text{NH}_2$  - oder SH-Gruppe des HG koppelt.
- 10

Der pH-Wert ist zwischen 3 und 7, vorzugsweise bei pH 5 zu halten. Die Umsetzungszeit liegt üblicherweise bei 3-15, vorzugsweise bei 6-8 Stunden.

- 15 Der Reinheitsgrad der erhaltenen Komplexe kann durch schnelle GPC überprüft und deren Molekulargewicht abgeschätzt werden. Weiter lassen sich folgende Parameter kontrollieren: Viskosität, Hämoglobin-Anteil, Polysaccharid-Anteil, Methämoglobin-Gehalt, Osmolarität und pH-Wert.
- 20 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

- a) Oxidation
- 25 8,5 g Dextran bzw. Hydroxyäthylstärke (HES) (0,05 Mol) werden in 100 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wird dann eine Lösung aus 1,2 g Natriumperjodat in 10 ml Wasser zugegeben. Die Mischung bleibt über Nacht bei  $+5^\circ \text{C}$  stehen. Das Oxidationsprodukt wird dann gegen aqua dest. dialysiert.
- 30

Die Reaktionsdauer wird mit wachsendem Substitutionsgrad bei HES entsprechend verlängert.

- 35 b) Umsetzung mit  $\alpha, \omega$ -Diamin
- Das dialysierte Oxidationsprodukt wird bei einem pH-Wert von etwa 5 mit 20 ml einer 2-molaren Lösung von

- 1 Äthylendiamin tropfenweise versetzt. Dabei muß der pH-Wert kontrolliert und evtl. nachjustiert werden. Anschließend wird bei Raumtemperatur 6-10 Stunden vorsichtig gerührt. Die Lösung wird danach mit dem gleichen Volumen 0,1 M TES  
5 versetzt, um überschüssige Aldehydfunktionen zu blockieren. Zum Schluß wird wiederum gegen aqua dest. dialysiert.

c) Umsetzung mit Glutardialdehyd

- Die Reaktionslösung/<sup>wird</sup>durch Zugabe von festem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  
10  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf pH 7,5 eingestellt, wobei eine Phosphatkonzentration von 0,5 Mol erreicht werden soll. Diese gepufferte Lösung wird in 50 ml einer 25%-igen wässrigen Glutardialdehyd-  
Lösung eingerührt, wobei der pH-Wert kontrolliert und ggf. nachjustiert wird. Die Umsetzung erfolgt bei  $37^\circ\text{C}$  in Was-  
15 ser, wobei 18 Stunden vorsichtig gerührt wird. Zur Entfernung überschüssigen Glutardialdehyds wird gegen aqua dest. dialysiert.

d) Kupplung mit Human-Hämoglobin

- 20 8 g Humanhämoglobin werden in 200 ml 0,2 M Bicarbonatpuffer pH 9,5 gelöst, dann in einem Druckfiltrationsgerät (Sartorius) über  $3\ \mu\text{m}$  Membranfilter filtriert und in die aus Stufe c erhaltene Lösung eingerührt, wobei diese Reaktion bei  $+5^\circ\text{C}$   
25 durchgeführt wird.

- Nach Ablauf der Kupplungsreaktion, die durch analytische Gelchromatographie verfolgt wird, wird wieder mit einem Filter der Porengröße  $3\ \mu\text{m}$  filtriert, um hochmolekulare Ver-  
netzungsprodukte abzutrennen. Das klare Filtrat wird zur  
30 weiteren Reinigung in einer Ultrafiltrationsanlage (AMICON) über eine Membran PM 10 fraktioniert und auf pH 7,4 umgepuffert. Die wässrige Lösung des Hämoglobin-Polysaccharid-Komplexes wird anschließend gefriergetrocknet.

- 35 Der Reinheitsgrad der Komplexe kann durch schnelle GPC überprüft und deren Molekulargewicht abgeschätzt werden (Pitz, LeKIM, Chromatographia, Bd. 12, (1979) S. 155). Weitere

1 Parameter bei der Qualitätskontrolle sind Viskosität, Hämoglobin-Anteil, Polysaccharid-Anteil, Hämoglobingehalt, Osmolarität und pH-Wert.

5 Beispiel 2

Die Stufen a und b gemäß Beispiel 1 werden wiederholt, wobei jedoch anstelle von Äthylendiamin Hydrazin eingesetzt wird. Das erhaltene Produkt, nämlich eine Schiff'sche Base wird mit Natriumborhydrid reduziert.

10

Nach Abschluß der Reaktion mit Hydrazin bei pH 5 wird der pH-Wert durch Zugabe von festem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf 9,0 eingestellt. Danach werden 10 ml einer frisch bereiteten 5 M wässrigen  $\text{NaBH}_4$ -Lösung unter Rühren in kleinen Anteilen zugegeben. Es wird 12 Stunden bei  $+5^\circ\text{C}$  weitergerührt, wobei zu starkes Schäumen vermieden werden soll. Die Zugabe von TES erübrigt sich, da auch überschüssige Aldehydgruppen durch Natriumborhydrid reduziert werden. Zur Entfernung von nicht umgesetztem Hydrazin sowie  $\text{NaBH}_4$  wird die Lösung gegen aqua dest.

20 dialysiert.

Die weitere Umsetzung mit Glutaraldehyd<sup>di</sup> und Kupplung mit Hämoglobin erfolgt entsprechend Beispiel 1.

25 Beispiel 3

Die Stufe a gemäß Beispiel 1, also Oxidation mit Natriumperjodat wird wiederholt. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit  $\omega$ -Aminocarbonsäure.

30

Zu einer Lösung aus 8 g oxidiertem Dextran (bzw. HES) werden bei einem pH-Wert von 5 insgesamt 20 ml einer 2M Lösung von 6-Aminocapronsäure in Äthanol/Wasser zugetropft. Dabei muß der pH-Wert kontrolliert und ggf. korregiert werden. Anschließend wird bei Raumtemperatur 6-10 Stunden vorsichtig gerührt. Zur Blockierung überschüssiger Aldehyd-Funktionen wird die Lösung mit dem gleichen Volumen 0,1 M TES versetzt und noch weitere 3 Stunden gerührt. Anschließend wird gegen

35

-H-

1 aqua dest. dialysiert. Die weitere Umsetzung mit Glutardialdehyd und Kupplung mit Hämoglobin erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

5 Beispiel 4

Das Polysaccharid wird wie in Beispiel 3 oxydiert und dann mit einer  $\alpha$ -Aminocarbonsäure umgesetzt. Das erhaltene Produkt wird mit Carbodiimid aktiviert und anschließend mit Hämoglobin gekuppelt.

10 Das Reaktionsprodukt aus Polysaccharid und der  $\alpha$ -Aminocarbonsäure wird unter Rühren mit 8 g Humanhämoglobinlösung in 100 ml Wasser versetzt. Der pH-Wert wird dann mit verdünnter Salzsäure auf 4,7 - 5,0 eingestellt. Unter Rühren wird 20 mg EDAC hinzugefügt. Der pH-Wert wird anschließend sofort wieder  
15 auf 5,0 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 6 Stunden wird das Carbodiimid durch Dialyse vollständig entfernt.

Beispiel 5

20 8,5 g Dextran 70 bzw. HES 200/0,5 werden in 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aufgelöst und anschließend wird eine Lösung aus 5,4 g p-Benzochinon in 20 ml Äthanol eingerührt. Zum Schluß der Reaktion wird nicht umgesetztes Benzochinon durch Dialyse entfernt. Zur Kupplung werden 8,0 g Human-Hämoglobin in  
25 200 ml Phosphat-Puffer pH 7 gelöst und mit der vorgelegten Dextran- (bzw. HES)-Benzochinon-Verbindung umgesetzt. Die Umsetzung erfolgt bei + 5° C. Der erhaltene Hämoglobin-Polysaccharid-Komplex wird - wie in Beispiel 1 beschrieben - gereinigt und analytisch untersucht.

30 In den Fig. 1 und 2 sind Elutionsdiagramme und in den Fig. 3 und 4 Absorptionsspektren der Umsetzungsprodukte gem. dargestellt.  
Beispiel 3 einerseits und von Hämoglobin Hb andererseits/  
Die Elutionsdiagramme von Humanhämoglobin Hb, Dextran-70-  
35 Hämoglobin D 70-Hb sowie Dextran-250-Hämoglobin D 250-Hb wurden auf Spheron P1000 durch schnelle GPC erhalten. Als chemische Brücke wurde 6-Aminocapronsäure eingesetzt. Sowohl aus den Elutionsdiagrammen als auch den Absorptions-

1 spektren kann entnommen werden, daß die durch die einzelnen  
Reaktionsteilnehmer erzeugten Endprodukte eine Veränderung  
im Elutionsverhalten als auch spektroskopische Veränderungen  
erzeugen, so daß sicher gestellt wird, daß tatsächlich makro-  
5 molekulare Kupplungsprodukte entstanden sind.

10

15

20

25

30

35

000000

Nummer: 3029307  
 Int. Cl. 3: A61K 31/715  
 Anmeldetag: 1. August 1980  
 Offenlegungstag: 4. März 1982

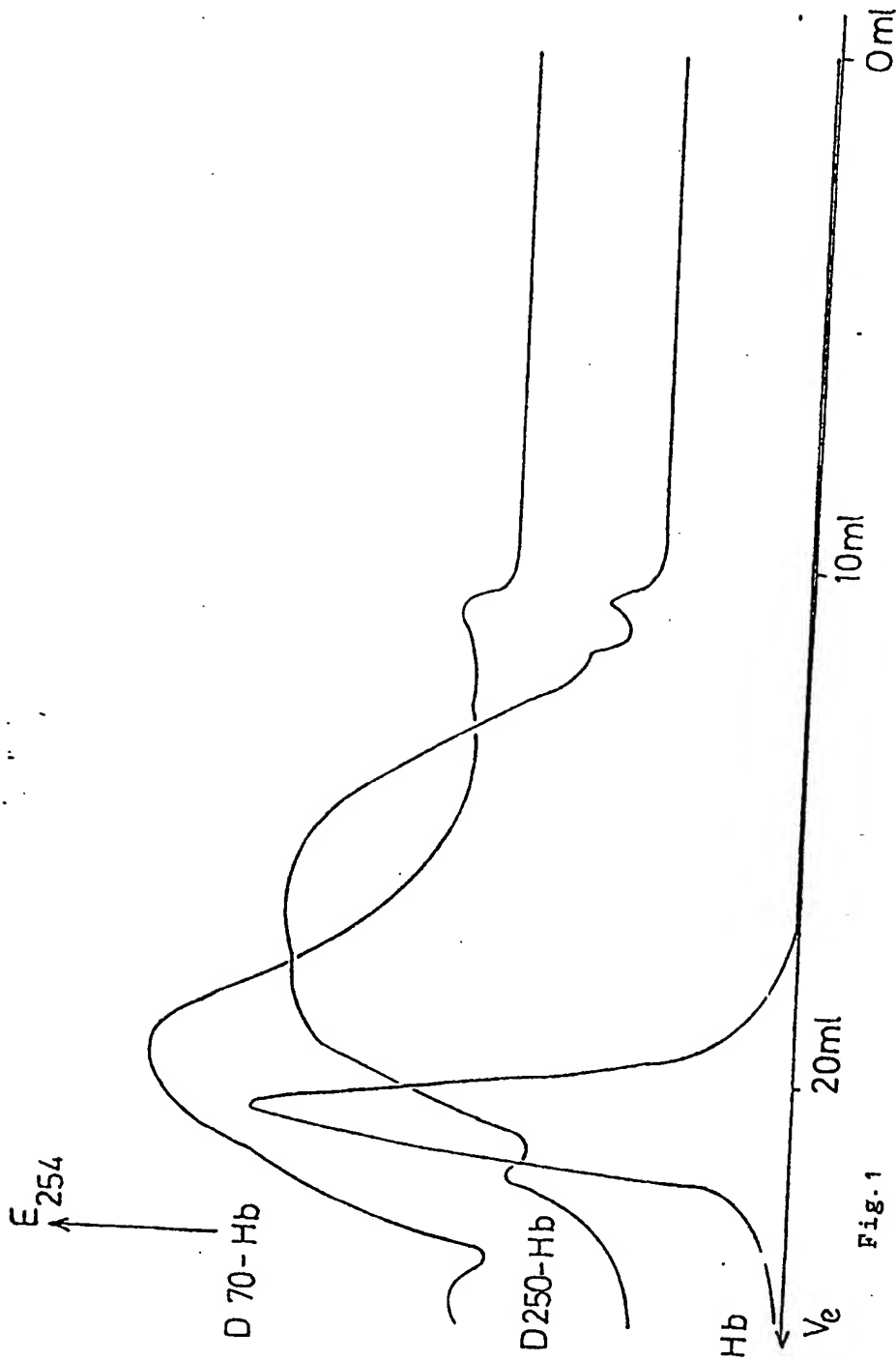


Fig. 1

**IHNEN & WACKER**  
 Patentanwaltsbüro -  
 Kuhn, Dipl.-Ing.  
 Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.  
 Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.

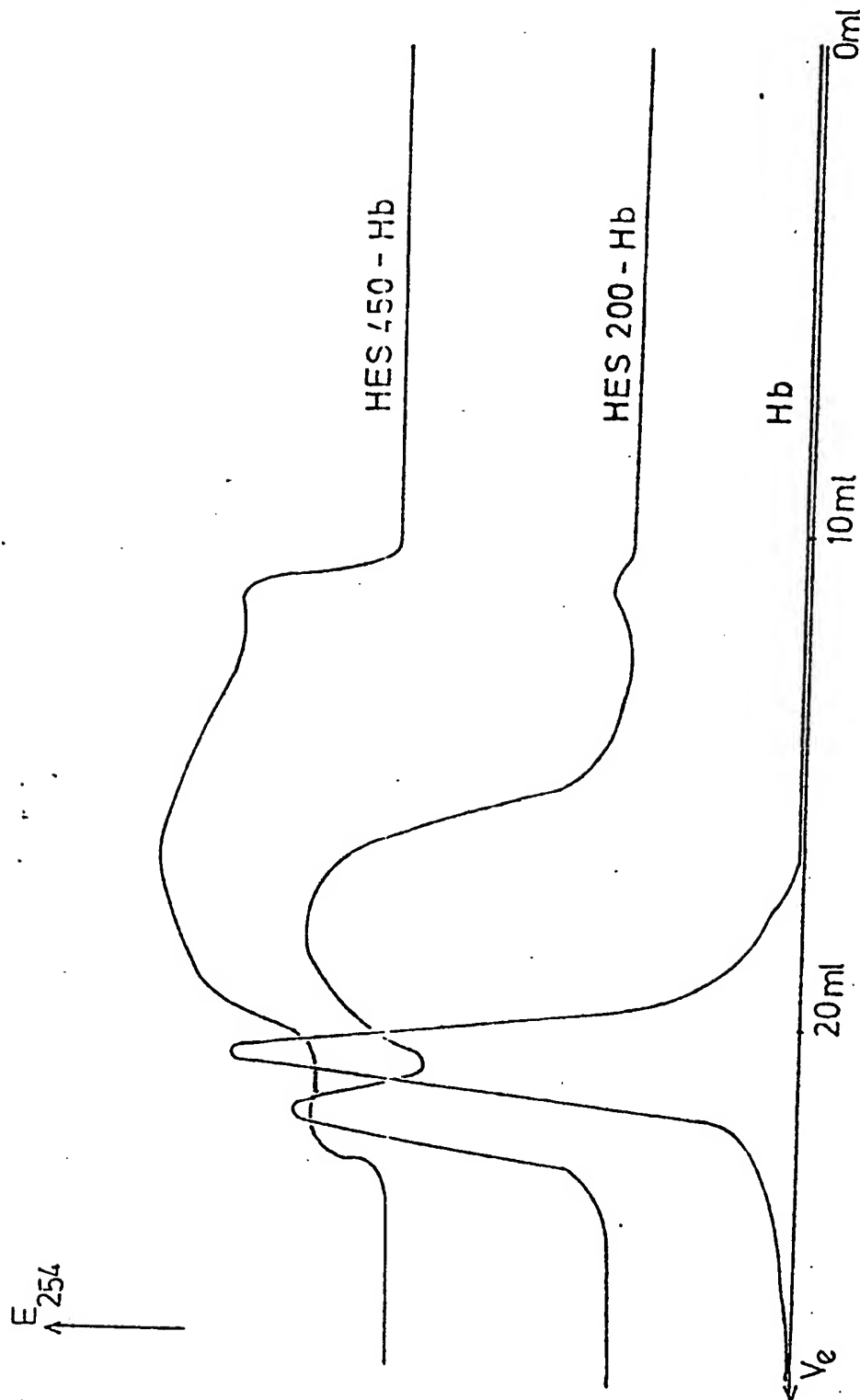
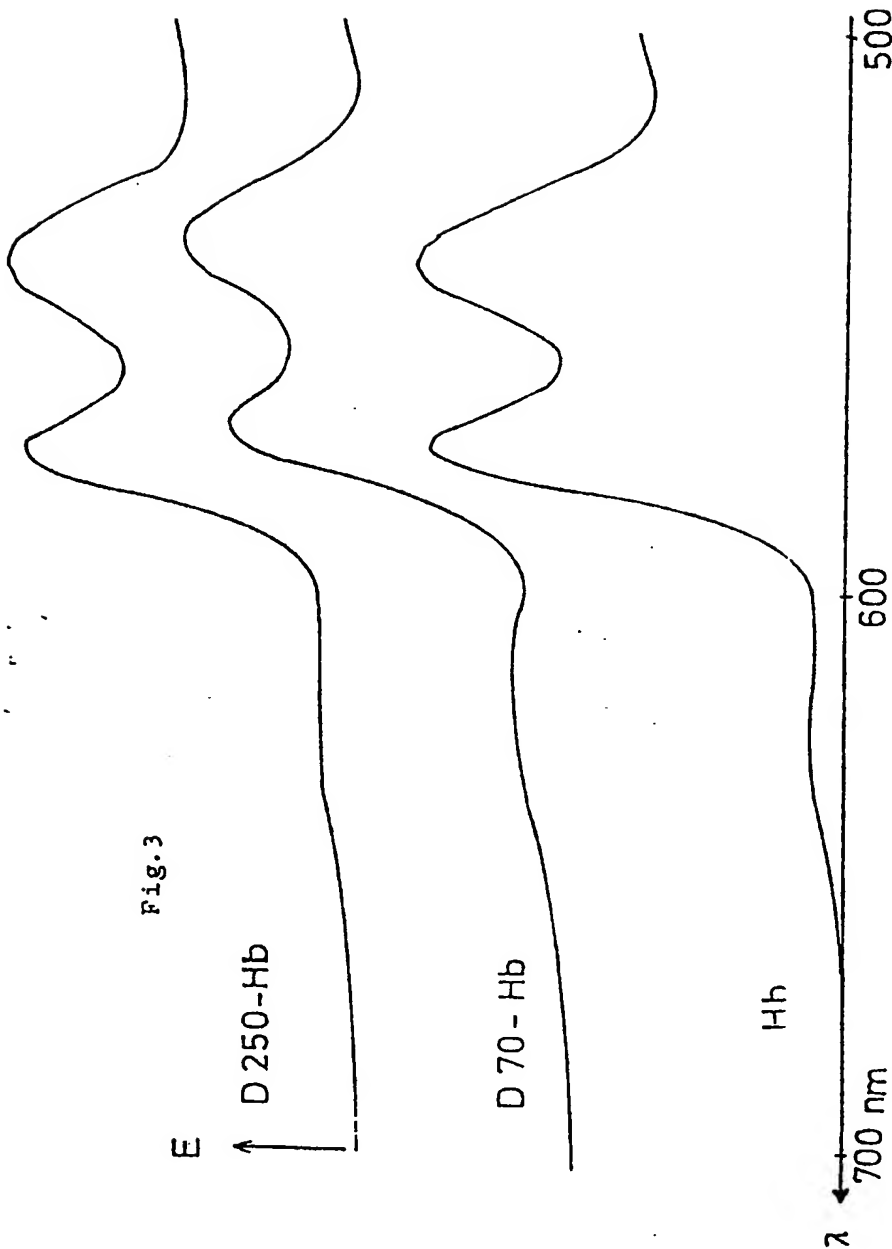


Fig. 2

**KUHNEN & WACKER**  
 - Patentanwaltsbüro -  
 R.A. Kuhnert, Dipl.-Ing.  
 W. Luderschmidt, Dr., Dipl.-Chem.  
 P.A. Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.  
 Schneggstr. 3-5, 8050 FREISING

ORIGINAL INSPECTED





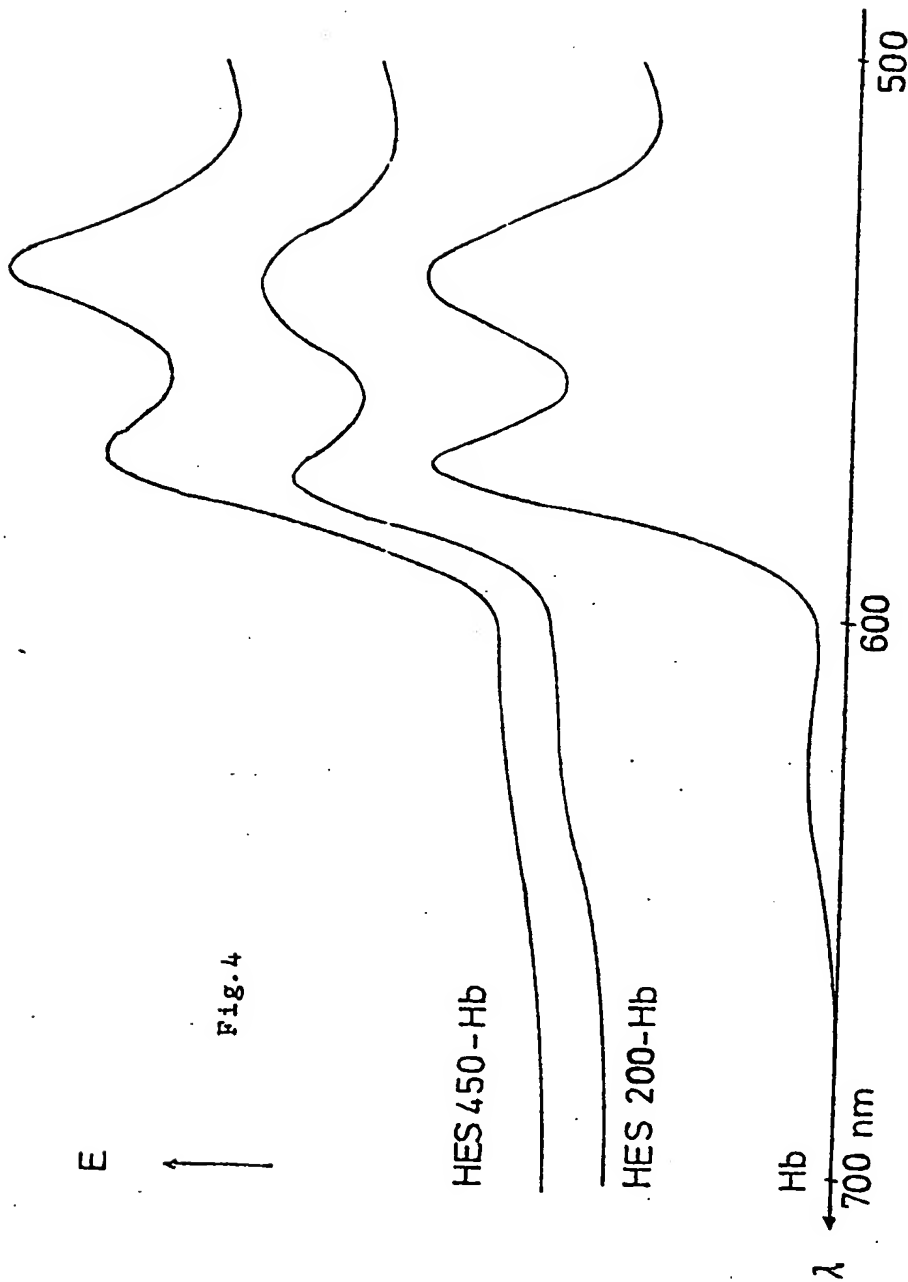
**UHNEN & WACKER**

Patentanwaltsbüro -

.. Kuhnert, Dipl.-Ing.

Luderschmidt, Dr., Dipl.-Chem.

.. Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**